

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/18, C07K 14/475, 16/22, C12N 5/10, A61K 38/22, 48/00, G01N 33/53, C12Q 1/68	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/22000 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Mai 1999 (06.05.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/03155 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Oktober 1998 (27.10.98) (30) Prioritätsdaten: 197 47 418.7 27. Oktober 1997 (27.10.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NIEHRS, Christof [DE/DE]; Klingenteichstrasse 6b, D-69117 Heidelberg (DE). GLINKA, Andrei [RU/DE]; Erlenweg 22, D-69126 Heidelberg (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: INHIBITOR PROTEIN OF THE WNT SIGNAL PATHWAY (54) Bezeichnung: INHIBITOR-PROTEIN DES WNT-SIGNALWEGS (57) Abstract <p>An inhibitor protein of the wnt signal pathway, a DNA coding for such a protein and a process for preparing such a protein are disclosed, as well as the use of the DNA and protein and antibodies against said protein.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, eine ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, eine ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

5

Der wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation und -Differenzierung während der Embryonal-Entwicklung von Drosophila, Xenopus laevis und der Maus. Der wnt-Signalweg umfaßt die Kombination von sekretorischen Glykoproteinen, die durch wnt-Gene, z.B. Xwnt-8, kodiert sind, und wnt-Rezeptoren, an die die Glykoproteine binden. Ferner ist der wnt-Signalweg beim Menschen kausal im Colon- und Mammakarzinom sowie dem Melanom impliziert (vgl. Peifer, M., Science 275, (1997), 1752-1753). Inhibitoren des wnt-Signalwegs könnten daher eine Möglichkeit darstellen, therapeutisch bei Tumorerkrankungen eingreifen zu können.

10

15

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem der wnt-Signalweg inhibiert werden kann.

20

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, wobei das Protein zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt.

25

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß in Tieren, besonders Säugetieren, ganz besonders dem Menschen, ein Protein existiert, das den wnt-Signalweg inhibiert. Der Anmelder hat gefunden, daß die

- 2 -

Expression des wnt-Gens, Xwnt-8, in *Xenopus laevis* zur Ausbildung von Siamesischen Zwillingen führt. Diese Mißbildung wird verhindert, wenn gleichzeitig das vorstehende Protein exprimiert wird. Dieses Protein ist ein sekretorisches Protein von etwa 40 kD. Es weist zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Cysteinreichen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II auf. Varianten des Proteins sind in Form ihrer DNAs in Fig. 2 angegeben. Desweiteren hat der Anmelder erkannt, daß Varianten des Proteins in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden (vgl. Tabelle 1 und Fig. 3).

10 In der vorliegenden Erfindung wird vorstehendes Protein mit "wnt-Inhibitor" (wnt-I) bezeichnet.

In bevorzugter Ausführungsform weist (wnt-I) die in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II auf.

15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für (wnt-I) kodierende Nukleinsäure. Diese kann eine RNA oder eine DNA sein. Letztere kann z.B. eine genomische DNA oder eine cDNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

20 (a) die DNA von Fig. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,

(b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder

25 (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

30 Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von (a) hybridisiert.

Die DNA von Fig. 2 umfaßt sieben DNAs, die aus *Xenopus laevis*, Maus, Mensch oder Huhn stammen und für (wnt-I) kodieren. Sechs dieser DNAs wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) am 19. Sept. 1997 wie folgt hinterlegt:

5

Fig. 2.1 (DNA aus Mensch) als phdkk-3 unter DSM 11762

Fig. 2.2 (DNA aus Huhn) trägt die Bezeichnung pcdkk-3

Fig. 2.3 (DNA aus Maus) als pmdkk-2 unter DSM 11759

Fig. 2.4 (DNA aus Mensch) als phdkk-2 unter DSM 11761

10 Fig. 2.5 (DNA aus Maus) als pmdkk-1 unter DMS 11758

Fig. 2.6 (DNA aus Mensch) als phdkk-1 unter DSM 11760

Fig. 2.7 (DNA aus *Xenopus laevis*) als pRNdkk-1 unter DSM 11757

Nachstehend wird eine erfindungsgemäße DNA in Form einer cDNA beschrieben.

15 Diese steht beispielhaft für jede unter die vorliegende Erfindung fallende DNA.

Zur Herstellung einer erfindungsgemäßen cDNA ist es günstig, von einer *Xenopus laevis*-cDNA-Bibliothek auszugehen (vgl. Glinka, A. et al., Mechanisms Develope. 60, (1996), 221-231). Von den einzelnen cDNA-Klonen werden
20 mittels RNA-Polymerase entsprechende mRNAs synthetisiert. Diese werden zusammen mit mRNA von wnt-Genen, z.B. Xwnt-8, in *Xenopus laevis* mikroinjiziert. Es wird auf die Ausbildung von Siamesischen Zwillingen bei *Xenopus laevis* gescreent. Diese werden erhalten, wenn die mRNA des wnt-Gens alleine oder zusammen mit solcher *Xenopus laevis* mRNA mikroinjiziert wird, die nicht
25 für (wnt-I) kodiert. Das Nicht-Auftreten von Siamesischen Zwillingen wird somit als Nachweis für das Vorliegen einer mRNA gewertet, die für (wnt-I) kodiert. Solch eine mRNA läßt unmittelbar die entsprechende cDNA erkennen.

Eine erfindungsgemäße cDNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor
30 vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu

nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4, anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

5 Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine, erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende cDNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

10

Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine erfindungsgemäße cDNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese cDNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße cDNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

15

Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. trans-fizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße cDNA exprimierte Protein zu isolieren und zu reinigen. Ein solches Protein, das auch ein Fusionsprotein sein kann, ist somit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

20

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehen-des Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklona-len Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fu-sions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklo-nalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

25

30

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, den wnt-Signalweg besser zu untersuchen und zu verstehen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (wnt-1) in Organismen nachgewiesen werden. Ferner kann mit einem erfindungsgemäßen (wnt-1) ein gegen dieses Protein gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot, einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen. Desweiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, die Expression des für (wnt-1) kodierenden Gens nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, erfolgen.

Somit können mit der vorliegenden Erfindung auch Prozesse besser untersucht, d.h. diagnostiziert, und verstanden werden, die mit dem wnt-Signalweg zusammenhängen. Dies sind z.B. Zellproliferation und -Differenzierung sowie Erkrankungen verschiedenster Art. Beispiele von letzteren sind Erkrankungen des Auges und der Knochen sowie Tumorerkrankungen, insbesondere Colon- und Mammakarzinom sowie Melanom.

Desweiteren eignet sich die vorliegende Erfindung, Maßnahmen für und gegen das Vorliegen von (wnt-1) in Organismen zu ergreifen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (wnt-1) in Organismen inhibiert werden. Andererseits kann mit einem erfindungsgemäßen (wnt-1), insbesondere nach Kopplung an ein vom Körper nicht als fremd angesehenes Protein, z.B. Transferrin oder BSA, die Menge von (wnt-1) in Organismen erhöht werden. Entsprechendes kann auch mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA, erreicht werden, die unter die Kontrolle eines in bestimmten Geweben induzierbaren Promotors gestellt wird und nach ihrer Expression zur Bereitstellung von (wnt-1) in diesen Geweben führt. Darüberhinaus kann eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, insbesondere eine DNA, auch zur Inhibierung von (wnt-1) genutzt werden. Hierzu wird die Nukleinsäure, z.B. als Basis für die Erstellung von Anti-Sinn-Oligonukleotiden zur Expressions-Inhibierung des für (wnt-1) kodierenden Gens verwendet.

Somit stellt die vorliegende Erfindung auch die Möglichkeit bereit, in den wnt-Signalweg aktivierend bzw. inhibierend einzugreifen. Erstes könnte z.B durch Verabreichung eines erfindungsgemäßen Antikörpers gegen (wnt-I) erfolgen. Für letzteres bietet sich an, erfindungsgemäßes (wnt-I) zu verabreichen. Die Aktivierung des wnt-Signalwegs könnte sinnvoll sein, wenn daran gedacht wird, Organismen für Organspende zu züchten. Die Inhibierung des wnt-Signalwegs bietet sich allerdings an, um therapeutisch bei Erkrankungen von Knochen und des Auges sowie bei Tumorerkrankungen, insbesondere Colon- und Mammakarzinomen sowie Melanom, eingreifen zu können.

Insbesondere zeichnet sich die vorliegende Erfindung dadurch aus, daß sie gewebespezifisch eingesetzt werden kann. Dies gilt sowohl für Diagnose als auch für Therapie. Beispielsweise eignet sich eine erfindungsgemäße DNA, DKK-1, ein entsprechendes Protein bzw. ein Antikörper davon besonders für Gewebe, wie Gehirn, Herz, Gefäße, Knochen, Knorpel, Bindegewebe und Auge. Ferner eignet sich eine erfindungsgemäße DNA, DKK-2, ein entsprechendes Protein bzw. ein Antikörper davon besonders für Gewebe, wie Gehirn, Herz, Gefäße, Knochen, Bindegewebe, Nieren, Hoden, Milz, Ovarien, Muskel, Uterus, Knorpel, Auge und Brustdrüse. Desweiteren eignet sich eine erfindungsgemäße DNA, DKK-3, ein entsprechendes Protein bzw. ein Antikörper davon, besonders für Gewebe, wie Gehirn, Herz, Gefäße, Knochen, Knorpel, Auge, Bindegewebe, Lunge, Ovarien, Muskel und Brustdrüse.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt die Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II eines erfindungsgemäßen (wnt-I). Die Angabe "-" bedeutet eine Aminosäure, wobei die Zahl der Aminosäuren variabel ist, wenn sie einen Stern aufweisen,

Fig. 2 zeigt die Basensequenz von sieben (wnt-I) kodierenden DNAs mit Angabe der Basen, die zu den Aminosäure-Konsensus-Sequenzen

von (wnt-I) beitragen.

Fig. 3 zeigt die Expression von drei (wnt-I) kodierenden DNAs, DKK-1, DKK-2 und DKK-3, in Geweben.

5

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen (wnt-I)

10 Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen (wnt-I) wurde die DNA von Fig. 2.6, phdkk-1 mit Bam HI-Linkern versehen, anschließend mit Bam HI gespalten und in den mit Bam HI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wurde das Expressionsplasmid pQ/wnt-I erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und einem erfindungsgemäßen (wnt-I) (C-Terminuspartner). pQ/wnt-I wurde zur Transformation von
15 E.coli SG 13009(vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien wurden in einem LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin und 25µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wurde eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wurde mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der
20 Angaben des Herstellers (Diagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wurde in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wurde das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).
25

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

30 **Beispiel 2: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers**
Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 wurde einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M

Natriumacetat wurde eine ca. 40 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke wurden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgte, bestimmt wurde. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein wurden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung wurden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)
Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wurde im Immunoblot getestet. Hierzu wurde ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurde das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurde das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgten mehrere Waschschriffe mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36 µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400 µM Nitroblau-tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar waren.

Es zeigte sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

5 Pro Immunisierung wurden 40µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

10 Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb wurden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es wurden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

15 Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

Pro Immunisierung wurden 12µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung war das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

20 Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)

Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)

Tag 87: Fusion

25

Überstände von Hybridomen wurden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper wurden nachgewiesen.

30

Tabelle 1: Expression von erfindungsgemäßen DNAs in Mausembryonen

	Dkk-1	Dkk-2	Dkk-3
Neuroepithelium			
E9.5 diencephalon	+++ ventral	+++ medial	+ medial
E12.5	telencephalon M/mantle	hypothalamus	telencephalon M/ ventricular zone
Eye	pigmented epithelium	choroid	retina
Spinal cord	-/+	-	ventricular zone Roof plate
Mesoderm:			
Heart E10	bulbis cordis Endocardium septum transversum	endothelium	myocardium
Heart E12	endocardial cushion	endothelium	endocardial cushion
Blood vessels	+++ aorta	+++ pulmonary artery	+++ aorta + pulmonary artery
Limbud mesenchyme	E9 S	I	D
Bone E12	perichondrium	S /mesenchyme	perichondrium I/mesenchyme

- 11 -

Bone E15	Ossification centers		
Urogenital	nephric duct		
	S-shaped body		
	Comma shaped body		
Palate	+++	++	+
Hair follicle	+++ mesenchyme + epithelium	+	+
Tooth mesenchyme	-	-	-
Trunk mesoderm	+/-	+++	+++

Legende: Mesoderm: (D) deep, (I) intermediate (L) lateral, (M) medial, (S), superficial.
 Expression: (-) absence, (+/-) very weak expression, (+) medium, (++) strong, (+++) very strong.

Patentansprüche

- 5 1. Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, wobei das Protein zumindest eine
 der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II
 umfaßt.
- 10 2. Protein nach Anspruch 1, wobei das Protein die Aminosäure-Konsensus-
 Sequenzen I und II umfaßt.
3. DNA, kodierend für das Protein nach Anspruch 1 oder 2.
4. DNA nach Anspruch 3, wobei die DNA umfaßt:
- 15 (a) die DNA von Fig. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Ba-
 senpaare unterschiedliche DNA,
 (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA oder
 (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten geneti-
 schen Code verwandte DNA.
- 20 5. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 3 oder 4.
6. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 5.
- 25 7. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2, umfas-
 send die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 6 unter geeigne-
 ten Bedingungen.
8. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 1 oder 2.
- 30 9. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2 als Reagens zur Dia-
 gnose und/oder Therapie.

10. Verwendung der DNA nach Anspruch 3 oder 4 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.

1/11

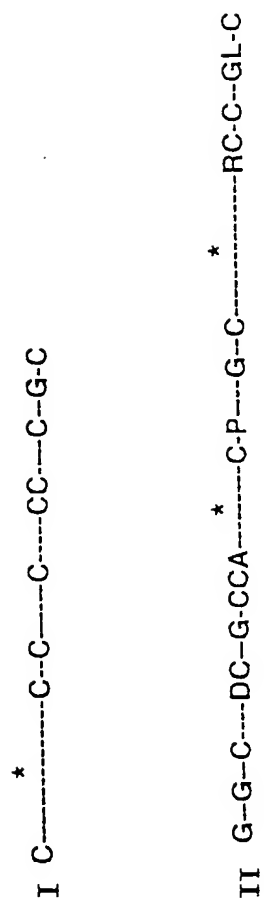


Fig. 1

312	CTGCTAAAGC	ATCATCAGAAAGTGAAACCTGGCAAACTTAC	CTCCAGCTAATACACAAATGAGAA	phdtkk-3
244	GGGCAAA	AAAAACCTGTCTCAGAAAGTAAACTTTGAA	AACTTACCTCCACCTAACCAATAAATGAGAT	pcdtkk-3
106	GCCACAGTCCCACCAAGGTTCA	TCAGCCCTGCAATGCTCTGTTA	pmdtkk-2
67	GCCACAGTCCCACCAAGGATCA	TCGGCCCTGCAATGGTGTTGTC	phdtkk-2
329	GCTCCAGCC	CAAGCCGGGGCAAGCCGGCTCCGGAGGTGTA	CAAGATCTGTCCTGGCTTGGCC	pmdtkk-1
314	GCGCTAGTCCCA	.CCCCCGCGGAGGGGACCGCCCGGCGGTG	CAAAATCTGTCCTGGCCCTGCA	phdtkk-1
361	GTCACAGTCCAGAAACGGCAACTCT	CTGGTTTGGCTTGGCAATGCC	pRNdtkk-1
372	CCAAACACAGAC	ACGAAAGGTTGGAAATAATAATACCA	TTCCATGTGCTACCCGAGAAATTCACAAAGT	phdtkk-3
304	CCAAACACAGAA	ACCAAGAAATGGTTAATAAATCA	CTGTCAGACTCAATCAAGAAATTGATTAAGG	pcdtkk-3
148	GGAAGGAA	AAAGAAATCGATGGCAACCGAGATGG	GAATGTGTTGGCCCTGGCTTGGCAAAAT	pmdtkk-2
109	GGAAGGAA	AAAGAAATCGATGGCAACCGAGATGG	GAATGTGTTGGCCCTGGCTTGGCAAAAT	phdtkk-2
389	GAAGGCGCAGGA	AGCGCTGGCATGATGATGTCCTGGCCCTGG	GAATGTGTTGGCCCTGGCTTGGCAAAAT	pmdtkk-1
371	GGAAGGCGCAGGA	AGCGCTGGCATGATGATGTCCTGGCCCTGG	GAATGTGTTGGCCCTGGCTTGGCAAAAT	phdtkk-1
406	GGAAGGCGCAGGA	AGCGCTGGCATGATGATGTCCTGGCCCTGG	GAATGTGTTGGCCCTGGCTTGGCAAAAT	pRNdtkk-1
432	TACAGATACAGAA	CTGGATCAACAAATTTTTCGGAGACAAATTA	TTACATCTATAAAGG	phdtkk-3
364	ATGGAATCTGCA	TTCCAGTCACTGAGAGCAATCCTCACCCCA	CAATATCCAG...CTCTGGG	pcdtkk-3
208	ATGGCATCTGTA	TTCCAGTCACTGAGAGCAATCCTCACCCCA	CAATATCCAG...CTCTGGG	pmdtkk-2
169	ATGGCATCTGTA	TTCCAGTCACTGAGAGCAATCCTCACCCCA	CAATATCCAG...CTCTGGG	phdtkk-2
449	ATGGAATATGCA	TTGCTCTGATCAAAATCA.....TTT	TTT...CCGAGGAGAAATGG	pmdtkk-1
431	ATGGAATATGCA	TTGCTCTGATCAAAATCA.....TTT	TTT...CCGAGGAGAAATGG	phdtkk-1
466	ATGGAATATGCA	TTGCTCTGATCAAAATCA.....TTT	TTT...CCGAGGAGAAATGG	pRNdtkk-1

Fig. 2 (Forts.)

[illegible]

Fig. 2 (Forts.)

phdkk-3
pcdkk-3
pmckk-2
phdkk-2
pmckk-1
phdkk-1
pRNdkk-1

phdck-3
pedck-3
pindck-2
phdck-2
pndck-1
phdck-1
pndck-1

433

GGTGAACCTTGCCATGATCCCTTCAACACAGACTTCTCTAACTTGATGAGAACTGGAA
AAGATGCCACCTACTCTTCCA...AAGCCAGACTTCCAATGTAATGGCAGAGAAGATCTGAT
AAGAAGTGCACCTACTCTCCA...AAGCCAGACTTCCAATGTAATGGCAGAGAAGATCTGAT
AAGATCATCATCAA...GCCAGCAATTCTTCTTAGGCTTCCACACCCTGGCAGAGAAGATCTGAT
AAGATCATCATCAA...GCCAGTAATTCTTCTTAGGCTTCCACACCCTGGCAGAGAAGATCTGAT
AAGGAGAAATTACAACTGTCCCTAAACATCTGAGACTTCCATCATCTTGGCAGAGAAGATCTGAT

Fig. 2 (Forts.)

433	CCTGATGGAGTACTAGAGCGCIGCCCA	TGTGC	AAGTGGCTTG	GAIC	FGCCAACCTCAGAGC
783	AAACACTG.GAAGAGTCATCACTAGCAGAC	TGTGAA	TTTGTGTA	TTTAA	TGCA TTATGGC
619	CACCATTGAGGAACATCATCAATTG	CAGAC	TGTGAA	GTGTGTA	TTTAA TGCA TTATAGC
580	ACCGACAGTC..TAAATATGATGGAC	TCTTT	TTATCTAA	TTATGCT	ACGAAAATC
856
829
983	CGAGGCCCTACAGAG.. CCTGAAGGAC	CTTCTCT	ATAAA	TTAAGCTAA	TTAAGACIT TGGTAC

[illegible]

433
903	G A G A T C C C T T G A A C A T G G A T G A G A T G C C A T T T A I C A G T T T A A T A C C C A G A G A T A T T C T T								
738	A A G A G G G C A G G A C T G A A T C A A G T A G A G T C G A C A A C A A C C A A A G I A C T A C C A G T G C T T C C G								
697	A A T A T A G A T G A T C A C A A A A A A A A A A A A A A A A G A T G C G G C C G C A A G C T I A T I C C C T T T A								
970	T C C G A C A A T A C T T T C C A A A A G C T C T G G A G T G T A A G G A C T T T G T T T C T T G A T G G A A C T C C C								
829
1001	C G C A A C T T G T T T C T T T T T T T G A G G A A C T T C C T A A T T A A T G C I A A T I A C A G T A A A T T A C T G								
	p h d k k - 3	p c o l k k - 3	p m d k k - 2	p h d k k - 2	p m d k k - 1	p h d k k - 1	p R N d k k - 1		

Fig. 2 (Forts.)

Fig. 2 (Forts.)

433
 J143 CATACACCCCTTAACAGATACTGCTGGATAGAAAGTGCAATAAACATCTTCATTGAGCATCC
 882
 769
 1210 AAAAAAAAAAAAAA
 829
 1241 IATTTTAAATTGAAATGAAACATTICTAAACTTAAAAACAATAAAAAAAAAA

phdkk-3
pcdkk-3
pmdkk-2
phdkk-2
pmdkk-1
phdkk-1
pRNdkk-1

433
1203 GTTTCGTCACCAAACCTGCGATGTTCAAATTCAATGTTGAATTCACCTCAATCTT166ACC
882
769
1227
829
1298

phdtkk-3
pcdtkk-3
pmdtkk-2
phdtkk-2
pmdtkk-1
pcdtkk-1
pRNdtkk-1

433
1263 AACTTTCCATCAAGACAAATGAGAAAGGCAATCAGTGTTTCCTTGGATTAAATCCTTTC
882
769
1227
829
1298

Fig. 2 (Forts.)

10/11

phdkk-3
pcdkk-3
pmdkk-2
phdkk-2
pmdkk-1
phdkk-1
cRNdkk-1

phdck-3
pcdck-3
pmdck-2
phdck-2
pmdck-1
phdck-1
pRNdck-1

433
1323 CTTGTACAGCAGAAATAAACGTATCAGTACTCGTACTCAITAAAAAACACACACGGAGCA
882
769
1227
829
1298

433 .
1383 T
882 .
769 .
1227 .
829 .
1298 .

Fig. 2 (Forts.)

11/11

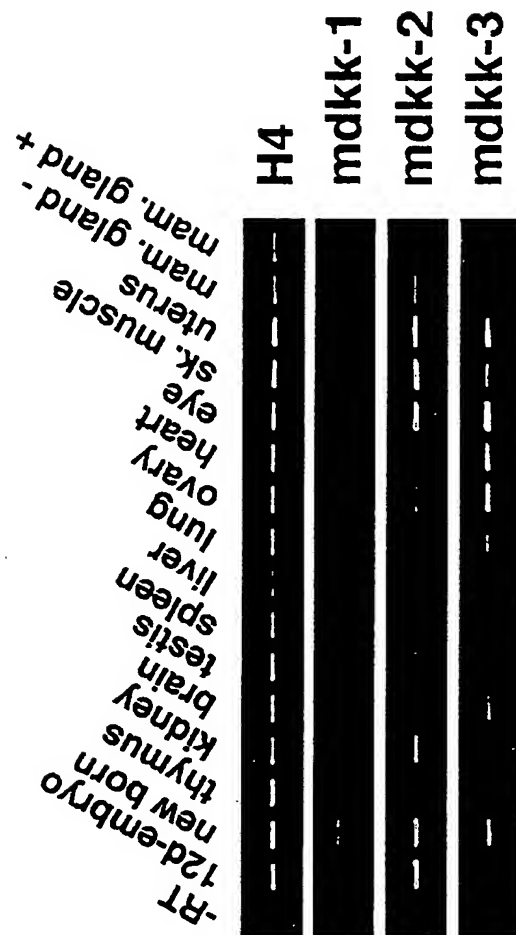


Fig. 3

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Deutsches Krebsforschungszentrum
- (B) STRASSE: Im Neuenheimer Feld 280
- (C) ORT: Heidelberg
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 69120

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Inhibitorprotein des wnt-Signalwegs

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 7

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER VORANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: DE 19747418.7

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1297 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GACAGTCGGA GCCGGCGCTG CAGCATCAA GGGACTTATC TTGGAGGACT TGTGAATTCT	60
CATCCTGCCA TTGTGGTTAC TGAGTCTGGT TGGACAGAGG AATGGGCAGC AACATGTTCC	120
CGGTGCCTCT TATTGTCTTT TGGGGTTTTA TCTTGGATGG GGCACCTGGC TTTGTCATGA	180
TGACCAACTC CAACTCCATC AAGAATGTGC CGGCGGCACC AGCAGGTCAG CCCATTGGCT	240
ACTACCTGT GAGCGTCAGT CCGGACTCCC TATATGATAT TGCCAACAAG TACCAACCTC	300
TGGATGCCTA CCGCTCTAC AGTTGCACGG AAGATGATGA CTGTGCCCTT GATGAATTCT	360
GTCACAGTTC CAGAAACGGC AACTCTCTGG TTTGCTTGGC ATGCCGAAA CGCAGAAAGC	420
GTGCTTGAG GGACGCCATG TGCTGCACAG GCAACTACTG TAGCAACGGA ATTTGTGTCC	480
CTGTGGAGCA AGATCAAGAG CGCTTCCAAC ACCAGGGATA CCTGGAAGAA ACCATTCTGG	540
AAACTATAA TAATGCTGAT CATGCAACAA TGGATACTCA TTCCAAATTA ACCACGTCCC	600

2

CATCTGGAAT GCAGCCCTTT AAAGGCCGTG ATGGTGATGT TTGCCTCCGA TCAACTGACT	660
GTGCGCCAGG TCTATGCTGT GCCCGTCATT TCTGGTCAAA GATCTGCAAG CCGGTCCCTG	720
ATGAAGGCCA AGTGTGCACC AAGCACAGGA GGAAAGGCTC TCACGGGCTA GAGATTTTCC	780
AGCGTTGTCA CTGCGGTGCC GGACTCTCGT GCCGGTTACA GAAAGGAGAA TTTACAACCTG	840
TCCCTAAAC ATCGAGACTT CACACTTGCC AAAGACACTA AGCGAGGCCT ACAGAGCCTG	900
AAGGACCTTC TCTAAATTAA GCTAATTAAG ACTTTGGTAC CTGCATGTTA TTTTCTCAGT	960
TTACATGAAG TGCTCTGGTC TTCCCTGAAC CCGGAAGCTG CGCAACTTGT TTCTTTTTTT	1020
GAGGAACTTC CTAATTAATG CTAATTACAG TAAATTACTG TGTGTAAAT ACTACGCAAG	1080
GAGACCTGTA AAAACTGTAA ATACCCGTGT ATAGAAAGTG TACATGATCT TCTCTATTGT	1140
AACCTGCCAC CTTGTACATT CCGACGCGCT CTTCCCTTTT TATATATATA TATATATAAA	1200
TATATATTAT ATTATGTAGA GTTTACGTCT AGTATGTCTG TATTTTAAAT TGAAATAAAA	1260
CATTTCTAAA CTTAAAAACA AAAAAAAAAA AAAAAA	1297

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 881 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

TGCAGGCATG AACAAAGGACT GGGTTCGGCG GCAGTGAGAA GGGCAAAGC CTGGGGCAGG	60
CCTACCCCTG CAGCAGTGAT AAGGAATGTG AAGTTGGAAG ATACTGCCAC AGTCCCCACC	120
AAGGTTCAATC AGCCTGCATG CTCTGTAGGA GGAAAAAGAA ACGATGCCAC AGAGATGGGA	180
TGTGTTGCCC TGGTACCCGC TGCAATAATG GAATCTGCAT CCCAGTCACT GAGAGCATCC	240
TCACCCACA TATCCAGCT CTGGATGGCA CCCGGCATAG AGATCGCAAC CATGGTCACT	300
ATTCCAACCA TGACCTGGGA TGGCAGAATC TAGGAAGGCC AACTCCAAG ATGCCTCATA	360
TAAAAGGACA TGAAGGAGAC CCATGCCTAC GGTCAACAGA CTGCATTGAT GGGTTTGTGTT	420
GTGCTCGCCA CTTCTGGACC AAAATCTGCA AACCAGTGCT CCATCAGGGG GAAGTCTGTA	480
CCAAACAACG CAAGAAGGGT TCGCACGGGC TGGAGATTTT CCAGAGGTGT GACTGTGCAA	540
AGGGCCTGTC CTGCAAAGTG TGGAAAGATG CCACCTACTC TTCAAAGCC AGACTCCATG	600
TATGCCAGAA GATCTGATAA AACTGGAAG AGTCATCACT AGCAGACTGT GAATTTGTGT	660

ATTTAATGCA TTATGGCATG ATGGAAACCT GGATTGGAAT GCGGAAGAAT GAGGGATGTG	720
GTAAGAATGT GGAGCAGAAG AGGGCAGGAC TGAATCAAGT AGAGTCGACA ACAACCAAAG	780
TACTACCAGT GCTTCCGTTA TGTGCCTCAT CTATGTAAAT AATGTACACA TTTGTGAAAA	840
TGCTATTATT AAAAGAAAGC ACACCATGGA AATTACAAAA A	881

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1226 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GACCCACGCG TCCGTGCCTG TTTGCGTCCT TCGGAGATGA TGGTTGTGTG TGCACCGGCA	60
GCTGTCCGGT TCTTGGCCGT GTTTACAATG ATGGCTCTCT GCAGCCTCCC TCTGCTAGGA	120
GCCAGTGCCA CCTTGAATC AGTTCTCATC AATTCCAACG CGATCAAGAA CCTGCCCCCA	180
CCGCTGGGTG GTGCTGGGGG GCAGCCGGGC TCTGCTGTCA GTGTGGCGCC GGGAGTTCTC	240
TATGAGGGCG GGAACAAGTA CCAGACTCTT GACAACTACC AGCCCTACCC TTGCGCTGAA	300
GATGAGGAGT GCGGCTCTGA CGAGTACTGC TCCAGCCCCA GCCGCGGGGC AGCCGGCGTC	360
GGAGGTGTAC AGATCTGTCT GGCTTGCCGA AAGCGCAGGA AGCGCTGCAT GACGCACGCT	420
ATGTGCTGCC CCGGAACTA CTGCAAAAAT GGAATATGCA TGCCCTCTGA CCACAGCCAT	480
TTTCCTCGAG GGGAAATTGA GGAAAGCATC ATTGAAAACC TTGGTAATGA CCACAACGCC	540
GCCGCGGGGG ATGGATATCC CAGAAGAACC AACTGACTT CAAAAATATA TCACACCAAA	600
GGACAAGAAG GCTCCGTCTG CCTCCGATCA TCAGACTGTG CCGCAGGGCT GTGTTGTGCA	660
AGACACTTCT GGTCCAAGAT CTGTAAACCT GTCCTTAAAG AAGGTCAGGT GTGCACCAAG	720
CACAAACGGA AAGGCTCCCA CGGGCTGGAG ATATTCCAGC GCTGTTACTG CGGGGAAGGC	780
CTGGCTTGCA GGATACAGAA AGATCACCAT CAAGCCAGCA ATTCTTCTAG GCTCCACACC	840
TGCCAGAGAC ACTAAACCGA CAGTCTAAAT ATGATGGACT CTTTTTATCT AATATATGCT	900
ACGAAAATCC TTTATGATTT GTCAGCTCAA TCCCAAGGAT GTAGGAATCT TCAGTGTGTA	960
ATTAAGCATT CCGACAATAC TTTCCAAAAG CTCTGGAGTG TAAGGACTTT GTTTCTTGAT	1020
GGAACCCCC TGTGATTGCA GTAAATTACT GTGTTGTAAA TCCTCAGTGT GGCACCTACC	1080
TGTAAATGCA GCAAACTTT TAATTATTTT TCTAGAGGTG TGGTACATTG CCTTGTTTCT	1140

CTTGCATGTA AATTTTTTTT GTACACGGTT GATTGTCTTG ACTCATAAAT ATTCTATATT 1200
 GGAGTAGAAA AAAAAAAAAA AAAAAA 1226

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 768 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ATACGACTCA CTATAGGGAA TTTGGCCCTC GAGGCCAAGA ATTCGGCACG AGGGTTGGGA 60
 GGTATTGCCA CAGTCCCCAC CAAGGATCAT CGGCCTGCAT GGTGTGTCGG AGAAAAAGA 120
 AGCGCTGCCA CCGAGATGGC ATGTGCTGCC CCAGTACCCG CTGCAATAAT GGCATCTGTA 180
 TCCCAGTTAC TGAAAGCATC TTAACCCCTC ACATCCCGGC TCTGGATGGT ACTCGGCACA 240
 GAGATCGAAA CCACGGTCAT TACTCAAACC ATGACTTGGG ATGGCAGAAAT CTAGGAAGAC 300
 CACACACTAA GATGTCACAT ATAAAAGGGC ATGAAGGAGA CCCCTGCCTA CGATCATCAG 360
 ACTGCATTGA AGGCTTTTGC TGTGCTCGTC ATTTCTGGAC CAAAATCTGC AAACCAGTGC 420
 TCCATCAGGG GGAAGTCTGT ACCAAACAAC GCAAGAAGGG TTCTCATGGG CTGGAAATTT 480
 TCCAGCGTTG CGACTGTGCG AAGGGCCTGT CTTGCAAAGT ATGGAAAGAT GCCACCTACT 540
 CCTCCAAAGC CAGACTCCAT GTGTGTCAGA AAATTTGATC ACCATTGAGG AACATCATCA 600
 ATTGCAGACT GTGAAGTTGT GTATTTAATG CATTATAGCA TGGTGGAAAA TAAGGTTTCAG 660
 ATGCAGAAGA ATGGCTAAAA TAAGAAACGT GATAAGAATA TAGATGATCA CAAAAAAAAA 720
 AAAAAAAG ATGCGGCCGC AAGCTTATTC CCTTTAGTGA GGGTTAAT 768

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 828 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TGGCCCCGCA CGCCAAAAAT TCGGCACGAG GGTCTGGCAC TCAGAGGATG CTCTGACCTT	60
GAAAGGGTCC TATCTGGAGA CGAGGGAGTA CAACGTGCTG AATGTGTGCG GTTCAGGGAG	120
CATTTGGTAA CCCTGCATTT GGGAGCAGTG GGCCTAACC GGTTTTGGAG AGGTGGACAC	180
ATAAGGACTG TGATCAGCGC CCGGGTCCAA GAGGGCGGGT ACCTGGACCT CTGGGTGCCT	240
CACCCTCTCC CCGAACCTT CCCACAGCCG TACCCGTGCG CAGAGGACGA GGAGTGCGGC	300
ACTGATGAGT ACTGCGCTAG TCCCACCCCG CGGAGGGGAC CGCCGGCCGT GCAAATCTGT	360
CTCGCCTGCA GGAAGCGCCG AAAACGCTGC ATGCGTCACG CTATGTGCTG CCCCAGGAAT	420
TACTGCAAAA ATGGAATATG TGTGTCTTCT GATCAAAATC ATTTCCGAGG AGAAATTGAG	480
GAAACCATCA CTGAAAGCTT TGGTAATGAT CATAGCACCT TGGATGGGTA TTCCAGAAGA	540
ACCACCTTGT CTTCAAAAAT GTATCACACC AAAGGACAAG AAGGTTCTGT TTGTCTCCGG	600
TCATCAGACT GTGCCTCAGG ATTGTGTTGT GCTAGACACT TCTGGTCCAA GATCTGTAAA	660
CCTGTCCTGA AAGAAGGTCA AGTGTGTACC AAGCATAGGA GAAAAGGCTC TCATGGACTA	720
GAAATATTCC AGCGTTGTTA CTGTGGAGAA GGTCTGTCTT GCCGATACA GAAAGATCAC	780
CATCAAGCCA GTAATTCTTC TAGGCTTCAC ACTTGTCAGA GACACTAA	828

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 432 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GCGGTGGCGG CCGCTCTAGA ATAGTGGATC CCCCAGGCTG CAGGAATTCG GCACGAGCGG	60
CTGCGGGCGC AGAGCGGAGA TGCAGCGGCT TGGGCCACCC TGCTGTGCCT GCTGCTGGCG	120
GCGGCGGTCC CCACGGCCCC CGCGCCCGCT CCGACGGCGA CCTCGGCTCC AGTCAAGCCC	180
GGCCCGGCTC TCAGCTACCC GCAGGAGGAG GCCACCCTCA ATGAGATGTT CCGCGGGTGA	240
GGAAGTATG GAGGACACGC AGCACAAATT GCGCAGCGCG GTGGAAGAGA TGGAGGCAGA	300
AGAAGCTGCT GCTAAAGCAA TCATCAGAAG TGAACCTGGC AAACCTACCT CCCAGCTATC	360
ACAATGAGAC CAACACAGAC ACGAAGGTTG GAAATAATAA CCATCCATGT GCACCGAGAA	420
ATTCACAAGT TT	432

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1383 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CGGCGAGCGG CAGCGGCGGC TGAGGAGCGC CGGGGATGCG GCGGGGAGAG GGACCGGCGC	60
CGCGGCGGCG ATGGCTGCTG CTGTTGGCCG TGCTGGCGGC TCTGTGCTGC GCCGCGGCCG	120
GGAGCGGCGG GCGGCGGCGA GCGGCCAGCC TGGGCGAGAT GCTGCGGGAG GTGGAGGCGC	180
TGATGGAGGA CACGCAGCAC AAGCTGCGCA ACGCCGTGCA GGAGATGGAA GCTGAAGAAG	240
AAGGGGCAAA AAAACTGTCA GAAGTAACT TTGAAACTT ACCTCCCACC TACCATAATG	300
AGTCCAACAC AGAAACCAGA ATTGGTAATA AAAGTGTCA GACTCATCAA GAAATTGATA	360
AGGTTACAGA TAACAGAACT GGATCAACAA TTTTTCCTGA GACAATTATT ACATCTATAA	420
AGGGTGGAGA AAACAAAAGA AATCATGAGT GTATCATTGA TGAAGACTGT GAAACAGGAA	480
AGTATTGCCA GTTCTCCACC TTTGAATACA AGTGTCAGCC CTGTAAAACC CAGCATACAC	540
ACTGCTCAG AGATGTTGAA TGCTGCGGAG ACCAGCTTTG TGTTTGGGGT GAGTGCAGGA	600
AAGCCACTTC AAGAGGAGAA AATGGTACCA TTTGTGAGAA CCAACATGAC TGCAACCCAG	660
GAACGTGCTG TGCTTTTCAG AAAGAACTGC TGTTTCCTGT GTGCACTCCG TTACCCGAAG	720
AAGGTGAACC TTGCCATGAT CCTTCAAACA GACTTCTCAA CCTGATCACC TGGGAACTGG	780
AACCTGATGG AGTACTAGAG CGCTGCCCAT GTGCAAGTGG CTTGATCTGC CAACCTCAGA	840
GCAGCCACAG TACTACATCT GTGTGTGAAC TGTCTCCAA TGAAACCAGG AAAAACGAAA	900
AAGAAGATCC CTTGAACATG GATGAGATGC CATTATCAG TTTAATACCC AGAGATATTC	960
TTTCTGATTA CGAAGAAAGC AGCGTCATTC AGGAAGTGGC TAAAGAATTA GAAAGCCTGG	1020
AGGACCAAGC AGGTGTGAAG TCTGAGCATG ACCCGGCTCA TGACCTATTT CTGGGAGATG	1080
AAATATGAAG TTCAAACACC AGTTTAGTTA GTCCTAGAAA TTGTTGTCTA GTGTCTTGCT	1140
TACATACACC CTTAACAGAT ACTGCTGGAT AGAAGTGCAA TAAACATCTT CATTGAGCAT	1200
CCGTTTTCGT GCACCAAACC TGCATGTTCA AATTCATGTT GAATTCATC AATCTTTGGA	1260
CCAACTTTC CATCAAAGAC AAATGAGAAA GGCATCAGTG TTTCTTTGG ATTAATCCTT	1320
TCCTTTGTAC AGCAGAAATA AACGTATCAG TACTCGTACT CATTAAAAAA ACACACGGAG	1380

CAT

1383

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No
PCT/DE 98/03155

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/18 C07K14/475 C07K16/22 C12N5/10 A61K38/22 A61K48/00 G01N33/53 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAWADA K ET AL: "Characterization of terminally differentiated cell state by categorizing cDNA clones derived from chicken lens fibers." INT J DEV BIOL, JUN 1996, 40 (3) P531-5, XP002096086 SPAIN see the whole document	3,4
X	-& EMVRT DATABASE Accession number D26311 29-JUL-1994 (Rel. 40, Created) Sawada K XP002096089 see the whole document <div style="text-align: center;">---</div> <div style="text-align: center;">-/--</div>	3,4
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">10 March 1999</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">23/03/1999</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Gurdjian, D</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/03155

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GLINKA A ET AL: "Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in Xenopus." NATURE, OCT 2 1997, 389 (6650) P517-9, XP002096087 ENGLAND see the whole document ---</p>	1-10
P,X	<p>GLINKA, ANDREI ET AL: "Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction" NATURE (LONDON) (1998), 391(6665), 357-362 CODEN: NATUAS;ISSN: 0028-0836, XP002096088 see the whole document -----</p>	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 98/03155

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Remark: Although claims 9, 10 relate to a method for treating the human/animal body insofar as they relate to an in vivo method, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
IPK 6	C12N15/18 A61K48/00	C07K14/475 G01N33/53
C07K16/22	C12N5/10	A61K38/22
C12Q1/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)		
IPK 6 C07K C12N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SAWADA K ET AL: "Characterization of terminally differentiated cell state by categorizing cDNA clones derived from chicken lens fibers." INT J DEV BIOL, JUN 1996, 40 (3) P531-5, XP002096086 SPAIN siehe das ganze Dokument	3,4
X	-& EMVRT DATABASE Accession number D26311 29-JUL-1994 (Rel. 40, Created) Sawada K XP002096089 siehe das ganze Dokument ---	3,4
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
10. März 1999		23/03/1999
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Gurdjian, D

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ²	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	GLINKA A ET AL: "Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in Xenopus." NATURE, OCT 2 1997, 389 (6650) P517-9, XP002096087 ENGLAND siehe das ganze Dokument ---	1-10
P,X	GLINKA, ANDREI ET AL: "Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction" NATURE (LONDON) (1998), 391(6665), 357-362 CODEN: NATUAS;ISSN: 0028-0836, XP002096088 siehe das ganze Dokument -----	1-10

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 9,10, insoweit bezogen auf ein in Vivo Verfahren sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.